PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/543	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/34114 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. August 1998 (06.08.98)
	L	veromentichungsustum: 0. August 1996 (00.00.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Januar 1997 (CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Stra D-64293 Darmstadt (DE).	MERO sse 25	Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DREMEL, Bernd Kölner Strasse 20, D-64293 Darmstadt (DE).	[DE/DI	I);
(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBI furter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).	H; Fran	ik-
		·

- (54) Title: METHOD FOR THE IMMUNOLOGICAL DETERMINATION OF AN ANALYTE
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG EINES ANALYTEN

(57) Abstract

The invention concerns a method for the immunological determination of an analyte in a sample using magnetic particles coated with the analyte to be determined or analyte-specific bonding partners and directly detectable non-magnetic particles coated with analyte-specific bonding partners or the analyte to be determined or using a non-magnetic substance which is indirectly detectable, and incubation of the reaction mixture. The method is characterized in that the magnetic particles are subsequently separated from the reaction mixture using a magnetic test strip and the analyte concentration is determined directly.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten in einer Probe mit Hilfe von mit dem zu bestimmenden Analyten oder analytspezifischen Bindungspartnern beschichteten magnetischen Partikeln und mit analytspezifischen Bindungspartnern oder dem zu bestimmenden Analyten beschichteten, direkt nachweisbaren nicht-magnetischen Partikeln oder einer indirekt nach weisbaren nicht-magentischen Substanz und Inkubation des Reaktionsgemisches. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel anschließend mit einem magnetischen Teststreifen aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und die Analytkonzentration direkt bestimmt wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

1-27

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

İ			6 t	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Albanien	RS	Spanien		Litauen	SK	Slowakei
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	***	SN	Senegal
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SZ	Swasiland
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland		Tschad
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
ВВ	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Turkei
BG	Bulgarien .	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP.	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
cz	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
1	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE		LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland	LK	LAUCAIG	50	~ 		

WO 98/34114 PCT/EP97/00403

Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten in einer Probelösung mit Hilfe von magnetischen und nichtmagnetischen Partikeln.

Immunologische Methoden zur Bestimmung von Analyten mit magnetischen und nicht-magnetischen Partikeln sind z.B. aus WO 95/04279 bekannt. Dabei werden nach der Inkubation die magnetischen Partikel durch ein magnetisches Feld in der Reaktionslösung niedergeschlagen; im Überstand wird dann der Analyt photometrisch bestimmt. In JP 05-52849 ist ein chromatographisches System beschrieben, das mit einem Magneten versehen ist. Das kapillare Medium erfüllt dabei die Aufgabe eines Filters. Die treibende Kraft, die den Analyten durch das Filter bzw. die Kapillare zwingt, ist die magnetische Kraft.

Die bekannten Verfahren haben eine Reihe von Nachteilen. Die magnetische Trennung der Partikel durch Niederschlagung in der Reaktionslösung hat den Nachteil, daß ein direkter photometrischer, fluorimetrischer oder elektrochemischer Nachweis des Analyten nicht ohne weitere Wasch- oder Trennschritte möglich ist. Ein Mangel der Filtrationssysteme besteht darin, daß die Filter bzw. Kapillaren leicht verstopfen, Viskositätsprobleme auftreten und der Analyt vorzeitig auf dem chromatographischen Material, d.h. vor der Bindungsreaktion, adsorbiert wird, so daß nur ausgewähltes Probengut zuverlässig analysiert werden kann.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die geschilderten Nachteile bei immunologischen Verfahren, die mit magnetischen Partikeln arbeiten, zu vermeiden und ein ganz einfaches und zuverlässiges Verfahren zur Verfügung zu stellen.

30

10

15

20

25

5

10

15

20

25

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten in einer Probe mit Hilfe von mit dem zu bestimmenden Analyten oder analytspezifischen Bindungspartnern beschichteten magnetischen Partikeln und mit analytspezifischen Bindungspartnern oder dem zu bestimmenden Analyten beschichteten, direkt nachweisbaren nicht-magnetischen Partikeln oder einer indirekt nachweisbaren nicht-magnetischen Substanz und Inkubation des Reaktionsgemisches, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die magnetischen Partikel anschließend mit einem magnetischen Teststreifen aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und die Analytkonzentration direkt bestimmt wird.

Vorzugsweise wird die Analytkonzentration direkt auf dem magnetischen Teststreifen visuell oder reflektrometrisch bestimmt. Die Bestimmung kann auch indirekt nach Entwickeln einer Farbreaktion oder elektrochemisch auf dem Teststreifen erfolgen.

Unter Analyt werden vor allem die diagnostisch relevanten Inhaltsstoffe von Körperflüssigkeiten, d.h. Haptene oder Antigene verstanden; unter den analytspezifischen Bindungspartnern sind monoklonale und polyklonale Antikörper zu verstehen.

Die magnetischen Teststreifen nach der Erfindung können z.B. ähnlich wie Disketten, Ton- oder Videobänder aus geeigneten magnetisierbaren Pigmenten hergestellt werden. Vorzugsweise eignen sich sehr flache Permanentmagnete. Die Verwendung von Seltene-Erden-Metallegierungen erlaubt die Herstellung von Permanentmagneten mit besonders hoher Remanenz. Im einfachsten Fall kann für das erfindungsgemäße Verfahren ein flacher Dauermagnet verwendet werden, der vollständig mit weißem, glatten Karton umhüllt und mit Kunststoffklebstreifen an den Rändern verklebt wird. Der magnetische Teststreifen kann durch Abwischen der magnetischen Partikel von der glatten Oberfläche nach der Testdurchführung mehrfach verwendet werden.

5

10

15

20

25

30

35

Ein großer Vorteil der Magnetstreifentechnologie im Vergleich zur direkten klassischen Kopplung von Antikörpern an die Oberfläche von Teststreifen ist darin zu sehen, daß die Reaktion mit dem Analyten zunächst homogen bzw. quasi-homogen abläuft. Diffusionsprobleme, die den unteren Detektionsbereich bei heterogenen Reaktionen zwischen Teststreifen und Analyten einschränken, spielen im homogenen Milieu praktisch keine Rolle.

Umgekehrt werden bei heterogenen Reaktionen, die oft diffusionslimitiert sind, verschiedene Maßnahmen unternommen, den Stoffaustausch zwischen Reaktionsoberfläche und Analytlösung zu verbessern (Filtration des Analyten durch die Teststreifenoberfläche). Die mit diesen Maßnahmen erzielbaren Vorteile können jedoch nicht den Vorteil der quasihomogenen Reaktion zwischen Analyten und kleinen suspendierten Partikeln mit hoher Oberfläche kompensieren (Probleme infolge von Porendiffusion, Clogging-Effekte).

Als Partikel können im Prinzip alle im Handel erhältlichen magnetischen und nicht-magnetischen Partikel, die auch farbig sein können, verwendet werden, sofern sie eine Größe von 30 nm bis 800 µm haben. Geeignete Partikel sind anorganische und organische Partikel, z.B. magnetische Partikel aus Eisen, Nickel, Cobalt, Mangan, Elementen der Lanthanidenreihe wie Neodym, Erbium usw, Partikel aus magnetischen Legierungen wie Aluminium-, Nickel-, Cobalt-, Kupferlegierungen, Oxide wie Fe₃O₄ CrO₂, CoO, NiO₂, Mn₂O₃ usw., Kompositmaterialien wie Ferrite und organische Polymere wie Polystyrol.

Als erfindungsgemäße Verfahren ist vor allem zum Nachweis von Analyten geeignet, für die spezifischer Bindungspartner existiert. Die Durchführung erfolgt z.B. nach den bekannten Verfahren der Sandwich-Immunoassays oder der kompetitiven Immunoassays. Nach der Inkubation werden die magnetischen Partikel mit Hilfe des magnetischen Teststreifens abgetrennt, so daß die direkt nachweisbaren nicht-magnetischen Partikel bzw. die indirekt nachweisbare nicht-magnetische Substanz in der Reaktionsmischung zurückbleiben, sofern sie nicht an die magnetischen Partikel gebunden werden. Der Nachweis erfolgt auf der Oberfläche des Teststreifens entweder direkt optisch, z.B. durch die An- oder Abwesenheit

andersfarbiger nicht-magnetischer Partikel, oder indirekt, z.B. wenn die nicht-magnetische Substanz ein Enzym ist, nach dem Entwickeln einer Farbreaktion auf dem Teststreifen. Handelt es sich bei der nicht-magnetischen Substanz um ein Enzym, so kann der Nachweis auf dem magnetischen Teststreifen auch elektrochemisch erfolgen. Bei dem Teststreifen handelt es sich dann um eine magnetische Elektrode.

10

5

Die direkte immunologische Bestimmung eines Analyten mit farbigen nicht-magnetischen Partikeln nach der Sandwich-Methode erfolgt z.B. so, daß ein Monoreagenz mit der Probelösung inkubiert wird. Das Monoreagenz besteht aus magnetischen Partikeln, die mit alalytspezifischen vorzugsweise monoklonalen Antikörpern beschichtet sind und andersfarbigen nicht-magnetischen Partikeln, die ebenfalls mit vorzugsweise monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, wobei diese Antikörper gegen ein anderes Epitop des Analyten gerichtet sind. Die Partikel sind in einer geeigneten Pufferlösung suspendiert. Ist in der Probelösung der Analyt zugegen, so können die andersfarbigen nicht-magnetischen Partikel an die magnetischen Partikel binden. Nach Ablauf einer hinreichenden Reaktionszeit werden die magnetischen Partikel aus der Reaktionsmischung mit einem magnetischen Teststreifen abgetrennt. Die an die Oberfläche des Teststreifens gebundenen magnetischen Partikel werden direkt visuell mittels einer Farbskala oder mit einem Reflektometer ausgewertet. Die Farbänderung auf dem Teststreifen hängt direkt von der Anzahl der gebundenen nicht-magnetischen andersfarbigen Partikel ab und ist proportional zur Analytkonzentration. Zwei Wellenlängenmessungen können darüber hinaus Inhomogenitäten beim Aufziehen der magnetischen Partikel auf den Teststreifen ausgleichen.

.

25

30

35

Die immunologische Bestimmung nach der Methode des kompetitiven Assays wird z.B. mit einem Bireagenz durchgeführt. Reagenz 1 enthält in einer geeigneten Pufferlösung magnetische Partikel, die mit analytspezifischen (monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpern beschichtet sind. Reagenz 2 enthält in der gleichen Pufferlösung andersfarbige nichtmagnetische Partikel, die mit dem zu bestimmenden Analyt beschichtet sind. Die Probelösung wird zunächst mit dem Reagenz 1 inkubiert. Ist in

*- <u>2.</u> 2.

5

10

15

20

25

30

35

der Probelösung der Analyt vorhanden, so werden Bindungsstellen der analytspezifischen Antikörper auf den magnetischen Partikeln entsprechend der Konzentration des Analyten in der Probe abgesättigt. Nach einer geeigneten Inkubationszeit wird das Reagenz 2 zur Reaktionsmischung gegeben. Die mit dem Analyten beschichteten andersfarbigen nicht-magnetischen Partikel können an die magnetischen Partikeln binden, sofern nicht die Bindungsstellen der Antikörper durch den Analyten bereits blockiert sind. Nach Ablauf einer bestimmten Reaktionszeit werden die magnetischen Partikel aus der Reaktionsmischung mit dem erfindungsgemäßen magnetischen Teststreifen abgetrennt. Die an die Oberfläche des Teststreifens gebundenen magnetischen Partikel werden direkt visuell mittels einer Farbskala oder mit einem Reflektometer ausgewertet. Die Farbänderung auf dem Teststreifen hängt direkt von der Anzahl der gebundenen nicht-magnetischen andersfarbigen Partikel ab und ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration. Zwei Wellenlängenmessungen können darüber hinaus Inhomogenitäten bei dem Aufziehen der magnetischen Partikel auf den Teststreifen ausgleichen. Das Bireagenz kann auch so zusammengesetzt sein, daß die magnetischen Partikel mit dem Analyten beschichtet sind, und die nicht-magnetischen Partikel mit dem Antikörper; das Nachweisprinzip ist unverändert.

Eine indirekte immunologische Bestimmung eines Analyten mit einer nichtmagnetischen Substanz, z.B. einem Enzym, nach der Sandwich-Methode kann wie folgt durchgeführt werden. Ein Monoreagenz, das in einer Pufferlösung magnetische Partikel enthält, die mit einem analytspezifischen, vorzugsweise monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, sowie eine nicht-magnetische Substanz, vorzugsweise ein Enzym, das mit vorzugsweise monoklonalen Antikörpern gekoppelt ist, jedoch einen Antikörper enthält, der gegen ein anderes Epitop des Analyten gerichtet als die Antikörper auf den magnetischen Partikeln. Dieses Monoreagenz wird mit der Probelösung inkubiert. Ist Analyt in der Probe vorhanden, so bindet die nicht-magnetischen Substanz an die magnetischen Partikel. Nach Ablauf einer bestimmten Reaktionszeit werden die magnetischen Partikel aus der Reaktionsmischung mit einem magnetischen Teststreifen abgetrennt. Anschließend wird auf dem Teststreifen eine chemische

Reaktion zum Nachweis der nicht-magnetischen Substanz durchgeführt. Handelt es sich bei der nicht-magnetischen Substanz um ein Enzym, so kann beispielsweise ein auf dem Teststreifen fixierter Leukofarbstoff enzymatisch in einen Farbstoff umgewandelt werden. Die Farbänderung auf dem Teststreifen kann direkt visuell mittels einer Farbskala oder mit einem Reflektometer ausgewertet werden. Sie ist proportional zur Analytkonzentration.

Geeignete Pufferlösungen sind solche, die in der Lage sind, einen pH-Bereich von 5 bis 9 aufrechtzuerholen, wie Phosphatpuffer, Tris-, Borat-, HEPES-, PIPES-Puffer usw.

Beispiel 1

15 Bestimmung von Cortisol nach dem kompetitiven Assay

Reagenz 1: 50 mM Phosphatpufferlösung mit suspendierten

magnetischen Partikeln, die mit anti-Cortisol-Antikörpern

beschichtet sind.

20

35

5

Reagenz 2: 50 mM Phosphatpufferlösung mit an alkalische

Phosphatase gekoppeltem Cortisol.

30 μl Probelösung (Serum) werden mit 150 μl Reagenz 1 3 Minuten
 vorinkubiert und anschließend weitere 3 Minuten mit 150 μl Reagenz 2 inkubiert. Durch kurzes Eintauchen des magnetischen Teststreifens in die Reaktionslösung (1 Minute) werden die suspendierten magnetischen Partikel an die Oberfläche des Teststreifens gebunden. Der Teststreifen wird anschließend für 1 Minute in die Substratlösung (para-Nitrophenylphosphatlösung) eingetaucht. Nach ca. 5 Minuten Reaktionszeit wird die Analytkonzentration qualitativ durch Farbvergleich mit einem Referenzteststreifen bestimmt.

Bei der Reaktion tritt ein Verdrängungswettbewerb zwischen dem gesamten Cortisol des Serums und dem mit alkalischer Phosphatasemarkierten Cortisol ein. Die Menge an markiertem Cortisol, das auf den

Partikeln gebunden wird ist um so höher, je geringer die Menge an gesamtem Cortisol im Serum ist. Der Farbumschlag auf dem Teststreifen ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration.

5 Beispiel 2

Bestimmung von Ferritin

Reagenz 1: 0,2 M Tris-Pufferlösung mit suspendierten magnetischen

10 Partikeln, die mit anti-Ferritin-Antikörpern beschichtet sind.

Reagenz 2: 0,2 M Tris-Pufferlösung mit an alkalische Phosphatase

gekoppeltem Ferritin.

Die Bestimmung wird analog Beispiel 1 mit para-Nitrophenylphosphat als Substratlösung durchgeführt. Nach 4 Minuten Reaktionszeit wird die Ferritinkonzentration qualitativ durch Farbvergleich des magnetischen Teststreifens mit Referenzteststreifen bestimmt.

20 Beispiel 3

35

Bestimmung von TNT in Wasserproben

Das TNT-Reagenz besteht aus einer 50 mM Phosphatpufferlösung vom pH 7,4 mit suspendierten magnetischen Partikeln (100 µg/ml), die mit anti-TNT-Antikörpern (lgG1, Lot: 103726 von Fa. SDI) beschichtet sind (Reagenz 1), sowie einer gepufferten Kompetitionslösung (TNT-alkalische Phosphatase-Konjugat, Lot: 103881, Fa. SDI, 1:80 verdünnt in 50 mM TRIS-Puffer, pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 0,1 mM ZnCl₂,

30 2,5 % BSA, 5 % Saccharose, 0,1 % NaN₃ (Reagenz 2).

100 µl Probe (TNT-Lösung in 40 mM HEPES-Puffer werden mit 150 µl Reagenz 1 2 Minuten vorinkubiert und anschließend weitere 2 Minuten mit 150 µl Reagenz 2 inkubiert. Durch Eintauchen des magnetischen Teststreifens in die Reaktionslösung (1 Minute) werden die suspendierten

-2.

Magnetpartikel an die Oberfläche des Teststreifens gebunden. Der Teststreifen wird anschließend für 1 Minute in eine Substratlösung (para-Nitrophenylsulfatlösung) eingetaucht. Nach weiteren 4 Minuten Reaktionszeit wird die Analytkonzentration qualitativ durch Farbvergleich mit dem Referenzteststreifen bestimmt. Die Gesamtanalysezeit beträgt ca. 10 Minuten.

Bei der Reaktion tritt ein Verdrängungswettbewerb zwischen dem TNT der Wasserprobe und dem AP-markierten TNT ein. Die Menge an markiertem TNT, das auf den Partikeln gebunden wird, ist um so höher, je geringer der TNT-Gehalt der Wasserprobe ist. Nach der Reaktion werden die magnetischen Partikel auf dem Teststreifen gebunden und in der Substratlösung inkubiert. Der Farbumschlag auf dem Teststreifen ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration.

5

10

Patentansprüche

- 1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten in einer Probe mit Hilfe von mit dem zu bestimmenden Analyten oder analytspezifischen Bindungspartnern beschichteten magnetischen Partikeln und mit analytspezifischen Bindungspartnern oder dem zu bestimmenden Analyten beschichteten, direkt nachweisbaren nichtmagnetischen Partikeln oder einer indirekt nachweisbaren nichtmagnetischen Substanz und Inkubation des Reaktionsgemisches, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Partikel anschließend mit einem magnetischen Teststreifen aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt und die Analytkonzentration direkt bestimmt wird.
- Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytkonzentration direkt auf dem magnetischen Teststreifen bestimmt wird.
- Verfahren zur immunologischen Bestimmung eines Analyten nach
 den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die
 Analytkonzentration indirekt nach Entwickeln einer Farbreaktion oder elektrochemisch bestimmt wird.

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intx onal Application No PCT/EP 97/00403

A. CLASSII IPC 6	FICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/543		·
	OCC as to both patients along fronti		
B. FIELDS	International Patent Classification (IPC) or to both national classifications	on and IFC	
	ourmentation searched (classification system followed by classification G01N	symbols)	
Documentat	ion searched other than minimum documentation to the extent that suc	th documents are included in the fields sear	rohed
Electronio d	ata base consulted during the international search (name of data base	and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMI	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the releva	ant passages	Relevant to daim No.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INTERNATI INC.) 9 October 1986 see claims 1-27	ONAL	1-3
A	EP 0 297 290 A (MILES INC.) 4 Jan see claims; figures 1,2	uary 1989	1-3
A	EP 0 170 446 A (SERONO DIAGNOSTIC LIMITED) 5 February 1986 see abstract; claims	SS .	1-3
A	EP 0 209 490 A (SERONO DIAGNOSTIC PARTNERS) 21 January 1987	S.	
E	DE 195 47 346 A (MERCK PATENT GMB June 1997 see the whole document	sH.) 26	1-3
Furt	ther documents are listed in the continuation of box C.	Patent family members are listed in	in annex.
° Special ca	ategories of cited documents:		
"A" docum	ent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance	"T" later document published after the inter- or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the	the application but
"E" earlier filing (document but published on or after the international date	invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot	t be considered to
which citatio	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another on or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or	involve an inventive step when the do "Y" document of particular relevance; the o- cannot be considered to involve an in- document is combined with one or m	claimed invention ventive step when the
other	means ent published prior to the international filing date but	ments, such combination being obvio in the art. "&" document member of the same patent	us to a person skilled
<u></u>	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea	
1	l October 1997	06.10.1997	
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Griffith, G	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inte .onal Application No PCT/EP 97/00403

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8605815 A	09-10-86	AU 5667186 A EP 0216844 A	23-10-86 08-04-87
EP 0297290 A	04-01-89	AU 584542 B AU 1749088 A DK 314388 A JP 1047954 A ZA 8802820 A	25-05-89 15-12-88 11-12-88 22-02-89 24-10-88
EP 0170446 A	05-02-86	AU 596946 B AU 4472685 A CA 1272507 A US 4978610 A	24-05-90 16-01-86 07-08-90 18-12-90
EP 0209490 A	21-01-87	CH 663476 A CA 1276596 A DE 3686967 A JP 7082016 B JP 62012858 A US 4793973 A	15-12-87 20-11-90 19-11-92 06-09-95 21-01-87 27-12-88
DE 19547346 A	26-06-97	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nte onales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00403

a klassii IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES G01N33/543		
	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klass	ifikation und der IPK	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
	RCHIERTE GEBIETE ter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbol	e)	
IPK 6	GOIN	-,	
Recherchie	te aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sow	veit diese unter die recherchierten Gebiete (allen
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Na	ame der Datenbank und evtl. verwendete S	suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angebe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 86 05815 A (GENETICS INTERNATI INC.) 9.0ktober 1986 siehe Ansprüche 1-27	ONAL	1-3
A	EP 0 297 290 A (MILES INC.) 4.Jan siehe Ansprüche; Abbildungen 1,2	nuar 1989	1-3
A	EP 0 170 446 A (SERONO DIAGNOSTIC LIMITED) 5.Februar 1986 siehe Zusammenfassung; Ansprüche	CS	1-3
A	EP 0 209 490 A (SERONO DIAGNOSTIC PARTNERS) 21.Januar 1987	cs ·	
E	DE 195 47 346 A (MERCK PATENT GME 26.Juni 1997 siehe das ganze Dokument	BH.)	1-3
	l itere Veröffentlichungen sind der Fartsetzung von Feld C zu nehmen	X Siehe Anhang Patentfamilie	
* Besondel *A* Veröffe aber *E* ålteres Anma *L* Veröffe sohei ande	re Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : entlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist entlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden der die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritättedatum weröffentlich Anmeldung nicht kollidiert, sondern nu Erfindung zugrundeliegenden Prinzips Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedekann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Bedekann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betr "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedekann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit	t worden ist und mit der r zum Verständnis des der oder der ihr zugrundeliegenden utung; die beanspruchte Erfindung chung nicht als neu oder auf sohtet werden utung; die beanspruchte Erfindung teit beruhend betrachtet
*O" Veröff eine l *P" Veröff	eführt) entlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht entlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselber	einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und naheliegend ist
	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cherohenberichts
:	1.0ktober 1997	06.10.999	7
Name und	Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	Bevolknächtigter Bediensteter	
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Griffith, G	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlicht. ... in, die zur selben Patentfamilie gehören

Intel nales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00403

im Recherchenbericht ungeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8605815 A	09-10-86	AU 5667186 A EP 0216844 A	23-10-86 08-04-87
EP 0297290 A	04-01-89	AU 584542 B AU 1749088 A DK 314388 A JP 1047954 A ZA 8802820 A	25-05-89 15-12-88 11-12-88 22-02-89 24-10-88
EP 0170446 A	05-02-86	AU 596946 B AU 4472685 A CA 1272507 A US 4978610 A	24-05-90 16-01-86 07-08-90 18-12-90
EP 0209490 A	21-01-87	CH 663476 A CA 1276596 A DE 3686967 A JP 7082016 B JP 62012858 A US 4793973 A	15-12-87 20-11-90 19-11-92 06-09-95 21-01-87 27-12-88
DE 19547346 A	26-06-97	KEINE	